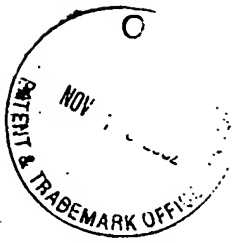


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 199 43 520.0

**Anmeldetag:** 11. September 1999

**Anmelder/Inhaber:** Dr. Michael Niederweis,  
Erlangen/DE;  
Dr. Stefan Bossmann,  
Karlsruhe, Baden/DE.

**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung eines  
kanalbildenden Proteins

**Priorität:** 31.08.1999 DE 199 41 416.5

**IPC:** C 07 K, C 12 N

BEST AVAILABLE COPY

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. Oktober 2002  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag



## Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Proteins

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Proteins, ein kanalbildendes Protein, ein Gen  
5 und ein mutiertes mspA-Gen, einen Plasmidvektor und ein Überexpressionssystem.

Die Erfindung betrifft allgemein das technische Gebiet der Herstellung von Nanostrukturen. Zu den bisher am besten charakterisierten Nanostrukturen gehören Kohlenstoff-Nanokanäle  
10 (Yakobson, B. I. and Smalley, R. E. Fullerene nanotubes: C<sub>1,000,000</sub> and beyond. *Am Sci* **85**, 324, 1997). Mit Kohlenstoff-Nanokanälen konnte gezeigt werden, daß die elektronischen Eigenschaften durch ihre strukturellen Details  
15 kontrolliert werden. Die Synthese von Kohlenstoff-Nanokanälen erfolgt durch verschiedene Varianten von CVD (chemical vapor deposition) (Fan, S., Chapline, M. G., Franklin, N. R., Tomblor, T. W., Cassell, A. M. and Dai, H. Self-oriented regular arrays of carbon nanotubes and their field emission properties. *Science* **283**, 512-4, 1999) und ist damit sehr aufwendig.  
20

Aus Johnson, S. A., Ollivier, P. J. and Mallouk, T. E. Ordered mesoporous polymers of tunable pore size from colloidal silica templates. *Science* **283**, 963-965 (1999) ist ein Verfahren zur Herstellung von organischen Nanokanälen auf der Grundlage eines Templates bekannt. Damit können Nanokanäle mit einem Durchmesser von 5 bis 35 nm hergestellt werden.  
25

Mycobakterien gehören zu einer Untergruppe von Gram-positiven  
30 Bakterien, die Mycolsäuren besitzen und die die Gattungen *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Dietzia* einschließen.



Trias, J. and Benz, R. Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 14, 283-290 (1994) beschreiben kanalbildende Proteine, nämlich Porine, in der Mycolsäure-Schicht von Mycobakterien. Biochemische oder molekulargenetische Daten über diese Porine wurden bisher nicht veröffentlicht.

Aus Lichtinger, T., Burkovski, A., Niederweis, M., Kramer, R. and Benz, R. Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of *Corynebacterium glutamicum*: the channel is formed by a low molecular mass polypeptide. *Biochemistry* 37, 15024-32 (1998) ist ein Verfahren zur Präparation von Porinen aus Corynebakterien bekannt. Dieses Verfahren ist relativ ineffizient.

15

Mukhopadhyay, S., Basu, D. and Chakrabarti, P. Characterization of a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 179, 6205-6207 (1997) beschreiben die Extraktion von Porinen aus *M. smegmatis* mit einem Puffer mit 1 % Zwittergent durch Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Ausbeuten waren schlecht und die Verunreinigung mit anderen Proteinen groß.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein einfaches und schnelles Verfahren mit verbesserter Ausbeute zur Herstellung kanalbildender Proteine angegeben werden. Die kanalbildenden Proteine sollen insbesondere zur Herstellung von Nanostrukturen geeignet sein.

30

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 23 bis 31 gelöst. Zweckmäßige Weiterbildungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 22 sowie ggf. 27 und 28.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines in Gram-positiven Bakterien vorkommenden kanalbildenden Proteins vorgesehen, wobei das kanalbildende Protein durch heterologe Expression oder durch Aufreinigung aus Mycobakterien gewonnen wird.

Unter den kanalartigen Proteinen werden solche Proteine verstanden, die natürlicherweise insbesondere in der Zellwand der Gram-positiven Bakterien vorkommen.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren ist wesentlich effizienter als die bisher beschriebenen Verfahren, bietet die Möglichkeit einer weitgehenden Automatisierung der chromatographischen Aufreinigung und ermöglicht eine drastisch erhöhte Ausbeute.

15

Das Gram-positive Bakterium kann ein mindestens eine Mycolsäure enthaltendes Bakterium sein. Nach einer Ausgestaltung ist das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium smegmatis*.

20

Das kanalbildende Protein kann ein Porin sein. Bevorzugt wird ein Porin, das gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch stabil und/oder bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise 100°C thermisch stabil ist.

25

Das Porin ist vorzugsweise MspA. Dieses Protein eignet sich wegen seinen überraschenden chemischen und thermischen Stabilität besonders gut zur Herstellung von Nanostrukturen.

30

Eine gute Ausbeute wird erzielt, wenn die heterologe Expression in *E.coli* durchgeführt wird. Zur weiteren Erhöhung der Ausbeute kann das kanalbildende Protein durch Überexpression, vorzugsweise aus *E.coli* oder Mycobakterien, gewonnen werden. Zweckmäßigerweise wird zur Expression ein für ein kanalbil-

dendes Protein, vorzugsweise ein Porin, codierendes Gen benutzt wird. Vorteilhaft ist es weiter, daß zur Überexpression ein mspA-Gen gemäß Sequenz 1 (siehe unten) benutzt wird. Zur Expression kann insbesondere aber auch ein von der Sequenz 1 abgeleitetes mutiertes Gen benutzt werden, wobei die Mutation so ausgebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im wesentlichen denen von MspA entspricht. Die Mutation kann auch im wesentlichen in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in *E.coli* hoch exprimierenden Gene bestehen. Zur Überexpression kann auch ein mutiertes mspA-Gen benutzt werden, wobei die Mutation im wesentlichen darin besteht, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist.- Die Anpassung der Codon-Benutzung verbessert die Überexpression von MspA in *E.coli* erheblich.

Durch Herstellung des kanalbildenden Proteins MspA aus *E. coli* kann die Ausbeute gegenüber dem oben beschriebenen Verfahren zur Präparation des nativen Proteins noch einmal um den Faktor 10 bis 20 gesteigert werden.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, zur Überexpression das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 zu benutzen. Dazu kann ein zur Überexpression in *E.coli* geeigneter Vektor verwendet werden, in den das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 eingesetzt ist. Solche geeigneten Vektoren sind z.B. von Hannig, G. und Makrides, S.C. in Trends in Biotechnology, 1998, Vol. 16, pp54 beschrieben. Der Offenbarungsgehalt dieses Dokuments wird hiermit einbezogen.

30

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, das kanalbildende Proteine mittels nicht-ionischer oder zwitterionischer Detergentien aus der Zellwand von Gram-positiven Bakterien zu gewinnen. Die Detergentien können aus der folgenden Gruppe

ausgewählt sein: Isotridecylpoly(ethyleneglycolether)<sub>n</sub>, Alkylglucoside, besonders Octylglucosid, Alkylmaltoside, besonders Dodecylmaltosid, Alkylthiogluconide, besonders Octylthiogluconid, Octyl-Polyethylenoxide und Lauryldiaminoxid.

5 Es ist zweckmäßigerweise eine zweifache kritischer micellarer Konzentration (CMC) in einem Phosphatpuffer (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5, 150 mM NaCl) eingestellt worden. - Die zwitterionischen und nicht-ionischen Detergentien lösen insbesondere das kanalbildende Protein MspA sehr selektiv und  
10 mit guter Ausbeute aus der Zellwand von *M. smegmatis*.

Es hat sich weiter als zweckmäßig erwiesen, daß die Temperatur bei der Extraktion zwischen 80 und 110 °C, vorzugsweise zwischen 90 und 100 °C, und/oder die Extraktionszeit 5 bis  
15 120 Minuten, vorzugsweise 25 - 35 Minuten, beträgt. Vorteilhaft ist weiter die Benutzung eines Puffers mit einer Ionenstärke von mehr als 50 mM NaCl oder Na-Phosphat.

Insbesondere eine Durchführung der Extraktion bei 100 °C die  
20 Verwendung eines Puffers mit hoher Ionenstärke sowie zwitterionischer und nicht-ionischer Detergentien verbessern das Extraktionsverfahren für Porine aus *Mycobacterium smegmatis*. Es bietet gegenüber den bisherigen Verfahren zur Aufreinigung solcher Proteine mit Hilfe organischer Lösungsmittel oder der  
25 Extraktion bei Raumtemperatur folgende Vorteile:

- aa) Verzicht auf organische Lösungsmittel
- bb) geringe Verunreinigungen mit anderen Proteinen
- cc) effiziente Extraktion

30

Es ist auch möglich, MspA zur Aufreinigung in Dimethylsulfoxid bei einer Temperatur im Bereich von 50 - 110 °C zu lösen; danach kann die Lösung vom Rückstand getrennt und MspA durch Abkühlen ausgefällt werden.

Durch heterologe Expression gewonnenes MspA kann durch kann durch Anlegen einer Gleichspannung renaturiert werden. Zweckmäßig ist das Anlegen einer Spannung im Bereich von 50 V für  
5 eine Zeit von etwa 30 Minuten.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein kanalbildendes Protein aus einem Gram-positiven Bakterium hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

10

Das Gram-positive Bakterium kann ein Mycolsäure enthaltendes Bakterium sein, wobei zweckmäßigerweise das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium smegmatis*, ist.

15 Von besonderem Vorteil ist es, daß das kanalbildende Protein ein Porin ist, das insbesondere gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch stabil ist. Das Porin ist vorzugsweise bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise 100°C, thermisch stabil. Es kann sich dabei um das Porin MspA handeln.  
20 Es ist aber auch denkbar, daß weitere hier nicht genannte Porine diese Eigenschaften aufweisen und damit vom Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfaßt sind.

Die erfindungsgemäßen kanalbildenden Proteine haben die folgenden Vorteile:  
25

aaa) Sie lassen sich in organischen Lösungsmittel (z. B.  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) lösen, ohne zu denaturieren. Die Fähigkeit zur Kanalbildung bleibt in organischen Lösungsmitteln erhalten.

30

bbb) Sie lassen sich mit Aceton fällen, ohne zu denaturieren.

ccc) Sie überstehen selbst Kochen in Detergentien (z. B. 10 min in 3% SDS), ohne zu denaturieren.

Diese extreme Stabilität der erfindungsgemäßen Proteine gegenüber chemischer und thermischer Denaturierung ermöglicht deren Verwendung zur Herstellung von technisch verwertbaren Nanostrukturen.

Nach Maßgabe der Erfindung wird weiterhin beansprucht ein Gen, kodierend für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, aus Gram-positiven Bakterien. Das Gen kann das mspA-Gen gemäß Sequenz 1 sein.

Als weiterer Gegenstand kommt auch ein mutiertes mspA-Gen in Betracht, wobei die Mutation im wesentlichen in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in *E.coli* hoch exprimierten Gene besteht. Die Mutation kann im wesentlichen darin bestehen, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist. Die Mutation kann aber auch so ausgebildet sein, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im wesentlichen der von MspA entspricht. Weitere hier nicht genannte Mutationen sind für den Fachmann ebenfalls denkbar. Gene, die zur Ausbildung der erfindungsgemäßen kanalartigen Proteine führen, sind vom beanspruchten Schutzzumfang umfaßt. Z.B. ein mutiertes mspA-Gen, wobei das mutierte Gen das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 (siehe unten) ist:

Nachfolgend werden anhand der Figuren Beispiele der Erfindung erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 die Reinigung von MspA aus *M. smegmatis* in chromatographischer Darstellung,

Fig. 2 die Reinigung von MspA aus *E. coli* in chromatographischer Darstellung,



Fig. 3 die Konstruktion des Plasmidvektors pMN501,

Fig. 4 eine schematische Ansicht einer Vorrichtung zur Renaturierung und

Fig. 5 ein renaturiertes MspA in chromatographischer Darstellung.

Fig. 1 zeigt die Reinigung des Kanalproteins MspA aus *M. smegmatis*. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel nach getrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt. Spuren: (M) Massenstandard: 200, 116, 97, 66, 55, 36.5, 31, 21.5, 14.4 kDa; (1) Extrakt von *M. smegmatis* mit PLD12-Puffer PLD012-Puffer (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.5, 150 mM NaCl, 0.12 % LDAO). (2) 33  $\mu\text{g}$  aufgereinigtes MspA. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Sequenz des mspA-Gen, mspA-Gen + Promotor sowie das MspA-Protein mit vermuteter Signalsequenz ist in den Sequenzprotokollen 1 - 3 wiedergeben.

Fig. 2 zeigt die Reinigung des Kanalproteins MspA aus *E. coli*. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt. Spuren: (1) Lysat von *E. coli* BL21(DE3)/pMN501 vor der Induktion durch IPTG. (2) Lysat von *E. coli* BL21(DE3)/pMN501 nach der Induktion durch IPTG. (3) Massenstandard: 200, 116, 97, 66, 55, 36.5, 31, 21.5, 14.4 kDa. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

In Fig. 3 ist schematisch die Konstruktion des Plasmids pMN501 zur Überexpression von MspA in *E. coli* BL21(DE3) dargestellt. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:

- 5    lacI:    Gen codierend für den Laktose-Repressor
- nptI:    Gen codierend für die Neomycinphosphotransferase; sie vermittelt Kanamycinresistenz
- Ori:    Replikationsursprung
- RBS:    Ribosomenbindestelle

10

Fig. 4 zeigt schematischen eine Vorrichtung zur Renaturierung von monomerem MspA. Eine Pipettenspitze aus Polyethylen von 5 cm Länge, dessen unteres Ende nach ca. 2 mm abgeschnitten wurde, wurde mit einer 1.7 %igen Agarose-Lösung (in TAE-Puffer) gefüllt. Eine Bleistiftmine (Typ: Eberhard Faber, 3H) wurde auf eine Länge von 5 cm gekürzt. Ein Polypropylengefäß ohne Deckel wurde mit 60 µl einer Lösung mit 5 µg denaturiertem MspA gefüllt und die Pipettenspitze und die Bleistiftmine in die Lösung gestellt. Dann wurde die Pipettenspitze als Kathode und die Bleistiftmine als Anode

15

20

angeschlossen.

Fig. 5 zeigt die Renaturierung von denaturiertem MspA. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel nach (Schägger, H. and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-79 (1987)) getrennt. Das Gel wurde mit Silber gefärbt. Spuren: (M) Massenstandard: 116, 97, 66, 55, 36.5, 31, 21.5, 14.4 kDa; (1) 800 ng denaturiertes MspA (2) 800 ng MspA nach der Renaturierungsreaktion. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

25

30

Die Fig. 6a bis c zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von Modifikationen des Kanalproteins MspA aus *M. smegmatis*. Die Herstellung der Proben erfolgt nach folgendem Protokoll: Ein Milliliter einer Lösung des Kanalproteins MspA ( $c(\text{MspA}) = 17,2 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ , 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5, 150 mM NaCl, 0,10 g/L SDS) werden bei 24,5°C in einem Ultraschallbad dispergiert. Zwischen der Flüssigkeitsoberfläche und der HOPG (Kohlenstoff) - Oberfläche ( $1,0 \text{ mm}^2$ ) wird ein konstanter Abstand von 5,0 cm eingestellt. Die HOPG-Oberfläche wird für 20 Sekunden den dispergierten Flüssigkeitströpfchen ausgesetzt.

In Fig. 6a liegen isolierte Kanalproteine vor. In Fig. 6b ist eine Bänderstruktur erkennbar, die große Poren mit einem Durchmesser von 12 nm aufweist. Aus Fig. 6c ist ersichtlich, daß die Bänderstruktur zwei Typen von Kanälen beitzzt, nämlich erste Kanäle mit einem kleinen Durchmesser von etwa 2.4 nm und zweite Kanäle mit größeren Durchmesser von etwa 9.0 bis 10,0 nm.

#### Beispiel 1: Aufreinigung von MspA aus *M. smegmatis*.

Zwei Liter 7H9-Medium mit 0.05 % Tween 80 und 0.2 % Glycerin werden mit *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 beimpft und 2 Tage bei 37°C geschüttelt (Jacobs, W. R., Jr., Kalpana, G. V., Cirillo, J. D., Pascopella, L., Snapper, S. B., Udani, R. A., Jones, W., Barletta, R. G. and Bloom, B. R. Genetic systems for mycobacteria. *Methods Enzymol* **204**, 537-55 (1991)).

7.9 g Zellen (Naßgewicht) werden nach Zentrifugation für 10 min bei 10000 g erhalten und in 28 mL PLD012-Puffer (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.5, 150 mM NaCl, 0.12 % LDAO) resuspendiert und 30 Minuten im Wasserbad gekocht. Dieser Rohextrakt wird mit 28 mL Aceton gefällt, der Niederschlag in 8 mL ALD012-Puffer Puffer (25 mM Hepes, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.12 % LDAO) aufgenommen und über eine G25-Säule mit demsel-

ben Puffer entsalzt. Die Protein-enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und an einem Anionenaustauscher (POROS HQ20) mit einem linearen NaCl-Gradienten von 10 mM bis 2 M NaCl getrennt. Natives MspA (100 kDa) eluiert bei 680 mM NaCl. Die Ausbeute beträgt 670 µg MspA mit einer Reinheit von über 90 % (s. Fig. 1).

Beispiel 2: Verfahren zur Präparation des Kanalproteins MspA aus *E. coli*

Zur weiteren Erhöhung der Ausbeute an MspA wird eine Überexpression des entsprechenden Gens vorgeschlagen. Zunächst wird das *mspA*-Gen kloniert, das für das Kanalprotein MspA aus *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 kodiert. Es wird das T7-Expressionssystem für die Überexpression des *mspA*-Gens gewählt.

Das *mspA*-Gen wird aus dem Plasmid pPOR6 über PCR amplifiziert. In der nativen *mspA*-Sequenz werden alle Codons verändert, die in stark exprimierten Genen aus *Escherichia coli* selten vorkommen. Im Sequenzprotokoll 4 (siehe unten), sind alle eingeführten Mutationen aufgelistet. Diese *synmspA* genannte DNA wird nach der Methode von Stemmer (Stemmer, W. P., Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M. and Heyneker, H. L. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* **164**, 49-53 (1995)) durch Assemblierung von Oligonucleotiden synthetisiert und anstelle des *mspA*-Gens in den Vektor pMN500 eingesetzt. Das resultierende Plasmid pMN501 (Fig.3) vermittelt in Zellen von *E. coli* BL21(DE3) eine starke Expression von denaturiertem MspA-Monomer (20 kDa) nach Induktion mit IPTG. Das so exprimierte MspA kann dem Sequenzprotokoll 5 (siehe unten) entnommen werden

Beispiel 3: Aufreinigung von MspA aus *E. coli*

Ein Liter LB-Medium mit 30 µg/mL Kanamycin wird mit *E. coli* BL21(DE3)/pMN500 beimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 geschüttelt. Dann wird mit 1 mM IPTG induziert und die  
5 Zellen noch sechs Stunden bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2.2 geschüttelt. Die Zellen werden in 40 mL A-Puffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM NaCl) resuspendiert und durch zehnminütiges Kochen in Wasser aufgeschlossen. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis werden die Zelltrümmer und die ausgefallenen  
10 Proteine durch Zentrifugation bei 10000 g für 10 min abgetrennt. Der Überstand wird an einem Anionenaustauscher (POROS HQ20) mit einem linearen NaCl-Gradienten von 10 mM bis 2 M NaCl getrennt. Denaturiertes MspA eluiert bei 350 mM NaCl. Um höhermolekulare Proteine abzutrennen, werden die  
15 Fraktionen mit MspA vereinigt und eine Gelfiltration durchgeführt. Die Ausbeute beträgt 10 mg MspA mit einer Reinheit von über 95 % (Daten nicht gezeigt).

Beispiel 4: Elektrochemische Assemblierung des Kanalproteins MspA

Durch die Überexpression von MspA in *E. coli* ist es zwar leicht möglich, das Kanalprotein mit einer guten Ausbeute zu isolieren. Das gewonnene Protein liegt zum großen Teil in inaktiver Form vor. Die Überführung in die aktive Form bzw. Renaturierung von monomerem MspA kann nach folgendem Protokoll  
25 erfolgen:

Die Renaturierung findet in einer speziell für diesen Zweck entwickelten Apparatur statt (Fig. 4). Die Renaturierungsreaktion wird mit 5 µg MspA in monomerer Form in dieser Reaktionsapparatur durch Anlegen einer Spannung von 50 V für  
30 30 min durchgeführt. Zum Schluß wird die Spannung für fünf Sekunden umgepolt, um an der Bleistiftmine adsorbiertes Porin wieder zu lösen.

Das Protein wird nach der oben beschriebenen Renaturierungsreaktion in einem Proteingel untersucht (s. Fig. 5). Dabei stellt sich heraus, daß ein großer Teil des Proteins zu oligomeren Einheiten assembliert ist. Durch Rekonstitutionsexperimente kann gezeigt werden, daß das MspA in dieser Form wieder hohe Kanalaktivität besitzt. Das beweist, daß die Renaturierung von MspA durch geringe Gleichspannungen möglich ist.

10 Diese Renaturierungsreaktion ist sehr einfach durchzuführen und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Präparation von funktionalem Kanalprotein MspA aus überproduzierenden *E. coli*.

15

Liste der Sequenzprotokolle:

1. mspA-Gen, translatiert
- 20 2. mspA-Gen + Promotor, translatiert
3. MspA-Proteins mit vermuteter Signalsequenz
- 25 4. synmspA-Gen, translatiert
5. rMspA-Protein

14  
SEQUENZPROTOKOLLE

<110> Niederweis Dr., Michael  
Bossmann Dr., Stefan

<120> Synthese von Nanostrukturen mit Kanalproteinen

<130> MN01

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 636

<212> DNA

<213> Mycobacterium smegmatis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(636)

<223> mspA-Gen

<400> 1

atg aag gca atc agt cgg gtg ctg atc gcg atg gtt gca gcc atc gcg	48
Met Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met Val Ala Ala Ile Ala	
1 5 10 15	

gcg ctt ttc acg agc aca ggc acc tct cac gca ggc ctg gac aac gag	96
Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala Gly Leu Asp Asn Glu	
20 25 30	

ctg agc ctc gtt gat ggc cag gac cgc acc ctc acc gtg cag cag tgg	144
Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu Thr Val Gln Gln Trp	
35 40 45	

gac acc ttc ctc aat ggt gtg ttc ccc ctg gac cgc aac cgt ctt acc	192
Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp Arg Asn Arg Leu Thr	
50 55 60	

cgt gag tgg ttc cac tcc ggt cgc gcc aag tac atc gtg gcc ggc ccc	240
Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr Ile Val Ala Gly Pro	
65 70 75 80	

ggt gcc gac gag ttc gag ggc acg ctg gaa ctc ggc tac cag atc ggc	288
Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu Gly Tyr Gln Ile Gly	
85 90 95	

ttc ccg tgg tgc ctg ggt gtg ggc atc aac ttc agc tac acc acc ccg	336
Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe Ser Tyr Thr Thr Pro	
100 105 110	

aac atc ctg atc gac gac ggt gac atc acc gct ccg ccg ttc ggc ctg	384
Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala Pro Pro Phe Gly Leu	
115 120 125	

aac tcg gtc atc acc ccg aac ctg ttc ccc ggt gtg tcg atc tcg gca	432
Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly Val Ser Ile Ser Ala	
130 135 140	

20



5

10

15

20

40

45

50

55

60

ggc tac.cag atc ggc ttc ccg tgg tcg ctg ggt gtg ggc atc aac ttc 819

17

Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe  
95 100 105

5      agc tac acc acc ccg aac atc ctg atc gac gac ggt gac atc acc gct    867  
     Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala  
                110                          115                          120

ccg ccg ttc ggc ctg aac tcg gtc atc acc ccg aac ctg ttc ccc ggt 915  
Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly  
10           125                 130                 135

gtg tcg atc tcg gca gat ctg ggc aac ggc ccc ggc atc cag gaa gtc 963  
Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val  
140 145 150 155

gca acg ttc tcg gtc gac gtc tcc ggc gcc gag ggt ggc gtg gcc gtg 1011  
Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala Val  
160 165 170

20 tcg aac gcc cac ggc acc gtg acc ggt gcg gcc ggc ggt gtg ctg ctg 1059  
Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu  
175 180 185

25      cgt ccg ttc gcc cgc ctg atc gcc tcg acc ggt gac tcg gtc acc acc    1107  
         Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr  
                190                         195                         200

30            tac ggc gaa ccc tgg aac atg aac tga ttcttgacc gccgttcggt            1154  
             Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn  
                        205                          210

cgctgagacc gcttgagatc ggcgcgtccc gctcccgggtg tcgtcagctc atcgttgaca 1214

cgtgaactga cactcttcct agccggagcg kacgcgccga tcttgtgttc tgagcagttc 1274

tcagtccgtc cgccgcaaca ccagcgctga cggcgtacgc agcctgccca ccaccgcgcg 1334

ccagggacgc cccagcctgg gcac'cacctc agcggtcggc acgatgcgcg gatcgggtcac 1394

40     ctcgaacgtc tcaccgttca tcaccgcgc                                1423

18

<210> 3  
 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium smegmatis  
 5  
 <220>  
 <221> SIGNAL  
 <222> (1)..(27)  
 <223> vermutete Signalsequenz des MspA-Proteins  
 10  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (28)..(211)  
 <223> reifes MspA-Protein  
 15  
 <400> 3  
 Met Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met Val Ala Ala Ile Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala Gly Leu Asp Asn Glu  
 20 25 30  
 Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu Thr Val Gln Gln Trp  
 35 40 45  
 25 Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp Arg Asn Arg Leu Thr  
 50 55 60  
 30 Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr Ile Val Ala Gly Pro  
 65 70 75 80  
 Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu Gly Tyr Gln Ile Gly  
 85 90 95  
 35 Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe Ser Tyr Thr Thr Pro  
 100 105 110  
 Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala Pro Pro Phe Gly Leu  
 115 120 125  
 40 Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly Val Ser Ile Ser Ala  
 130 135 140  
 45 Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val Ala Thr Phe Ser Val  
 145 150 155 160  
 Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala Val Ser Asn Ala His Gly  
 165 170 175  
 50 Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu Arg Pro Phe Ala Arg  
 180 185 190  
 Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr Tyr Gly Glu Pro Trp  
 195 200 205  
 55 Asn Met Asn  
 210  
 60

<210> 4  
<211> 558  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

5  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:synthetisch

10  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(558)  
<223> synmspA-Gen

<400> 4

15  
atg ggc ctg gac aac gaa ctg tcc ctg gtt gac ggc cag gac cgt acc 48  
Met Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr  
1 5 10 15

20  
ctg acc gtt cag cag tgg gac acc ttc ctg aac ggt gtt ttc ccg ctg 96  
Leu Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu  
20 25 30

25  
gac cgt aac cgt ctg acc cgt gaa tgg ttc cac tcc ggt cgt gcg aaa 144  
Asp Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys  
35 40 45

30  
tac atc gtt gcg ggt ccg ggt gcg gac gag ttc gaa ggt acc ctg gaa 192  
Tyr Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu  
50 55 60

35  
ctg ggt tac cag atc ggc ttc ccg tgg tcc ctg ggt gtt ggt atc aac 240  
Leu Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn  
65 70 75 80

40  
ttc tct tac acc acc ccg aac atc ctg atc gac gac ggt gac atc acc 288  
Phe Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr  
85 90 95

45  
gct ccg ccg ttc ggt ctg aac tct gtt atc acc ccg aac ctg ttc ccg 336  
Ala Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro  
100 105 110

50  
ggt gtt tct atc tct gct gat ctg ggc aac ggt ccg ggt atc cag gaa 384  
Gly Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu  
115 120 125

55  
gtt gct acc ttc tct gta gac gtc tct ggt gct gaa ggt ggt gtt gct 432  
Val Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala  
130 135 140

60  
gtt tct aac gct cac ggc acc gtt acc ggt gcg gct ggc ggt gtt ctg 480  
Val Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu  
145 150 155 160

55  
ctg cgt ccg ttc gct cgt ctg atc gct tct acc ggt gac tct gtt acc 528  
Leu Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr  
165 170 175

60  
acc tac ggt gaa ccg tgg aac atg aac tga 558  
Thr Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn  
180 185

20

<210> 5  
<211> 185  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

5

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(184)  
<223> rMspA

10

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:synthetisch

<400> 5

15 Met Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu  
20 25 30

Asp Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys  
35 40 45

25

Tyr Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu  
50 55 60

Leu Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn  
65 70 75 80

30

Phe Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr  
85 90 95

Ala Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro  
100 105 110

35

Gly Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu  
115 120 125

40

Val Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala  
130 135 140

Val Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu  
145 150 155 160

45

Leu Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr  
165 170 175

Thr Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn  
180 185

50

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines in Gram-positiven Bakte-  
rien vorkommenden kanalbildenden Proteins, wobei das kanal-  
5 bildende Protein durch heterologe Expression oder durch Auf-  
reinigung aus Mycobakterien gewonnen wird.
2. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Gram-positive Bakterium ein mindestens eine Mycolsäure  
10 enthaltendes Bakterium ist.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium*  
*smegmatis*, ist.  
15
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das kanalbildende Protein ein Porin ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
20 das Porin gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch sta-  
bil ist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Porin bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise  
25 100°C, thermisch stabil ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Porin MspA ist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
30 die heterologe Expression in *E.coli* durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das kanalbildende Protein durch Überexpression, vorzugsweise  
35 aus *E.coli* oder Mycobakterien, gewonnen wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Expression ein für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, codierendes Gen benutzt wird.

5

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Expression ein mspA-Gen gemäß Sequenz 1 benutzt wird.

10

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Expression ein von der Sequenz 1 abgeleitetes mutiertes Gen benutzt wird, wobei die Mutation so ausgebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des expimierten Proteins im wesentlichen denen von MspA entspricht.

15

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Mutation im wesentlichen in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in *E.coli* hoch exprimierten Gene besteht.

20

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Überexpression ein mutiertes Gen benutzt wird, wobei die Mutation im wesentlichen darin besteht, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist.

25

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Überexpression das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 benutzt wird.

30

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein zur Überexpression in *E.coli* geeigneter Vektor verwendet wird, in den das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 eingesetzt ist.



17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die kanalbildenden Proteine mittels nicht-ionischer oder zwitterionischer Detergentien aus der Zellwand von Gram-positiven Bakterien gewonnen werden.

5

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Detergentien aus der folgenden Gruppe ausgewählt sind: Isotridecylpoly(ethyleneglycolether)<sub>n</sub>, Alkylglucoside, besonders Octylglucosid, Alkylmaltoside, besonders Dodecylmaltosid, Alkylthioglucoside, besonders Octylthioglucosid, Octyl-Polyethylenoxide und Lauryldiamminoxid.

10

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Temperatur bei der Extraktion zwischen 80 und 110 °C, vorzugsweise zwischen 90 und 100 °C, beträgt.

15

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Extraktionszeit 5 bis 120 Minuten, vorzugsweise 25 - 35 Minuten, beträgt.

20

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Puffer mit einer Ionenstärke von mehr als 50 mM NaCl oder Na-Phosphat benutzt wird.

25

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei durch heterologe Expression gewonnenes MspA durch Anlegen einer Gleichspannung renaturiert wird.

30

23. Kanalbildendes Protein aus einem Gram-positiven Bakterium hergestellt nach dem Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche.

24. Gen kodierend für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, aus Gram-positiven Bakterien.



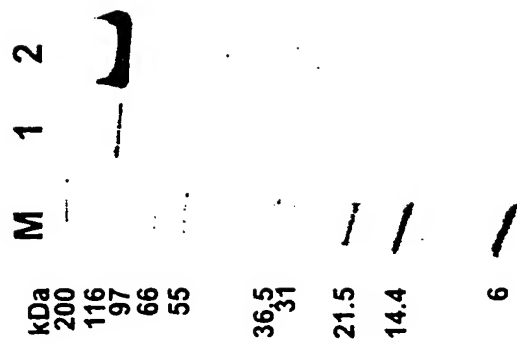


Fig. 1

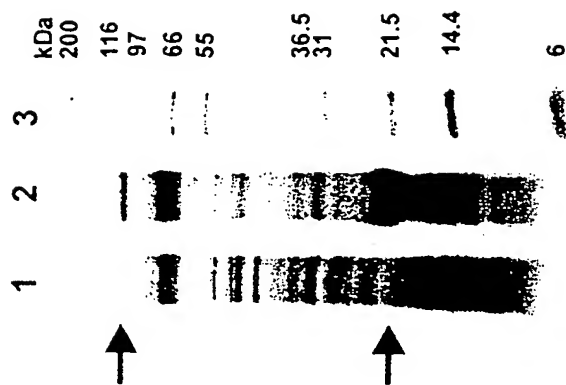


Fig. 2

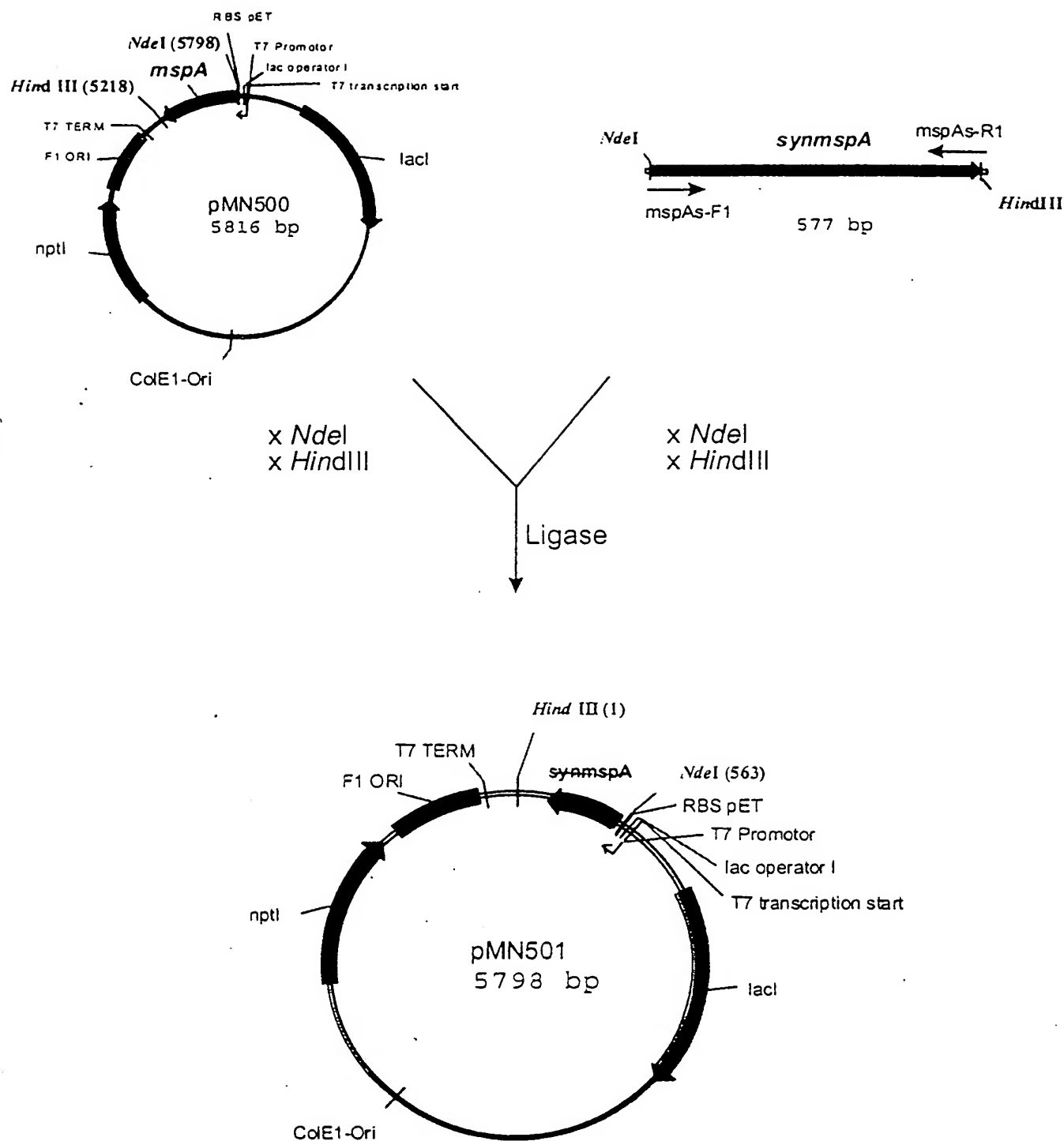


Fig. 3

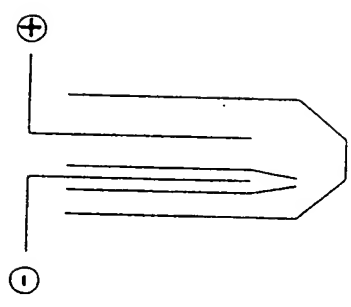


Fig. 4

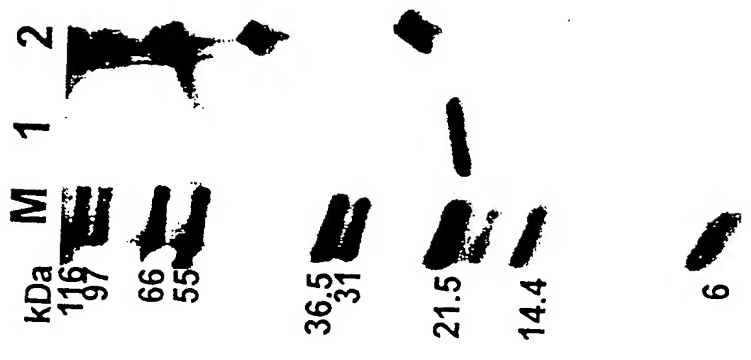
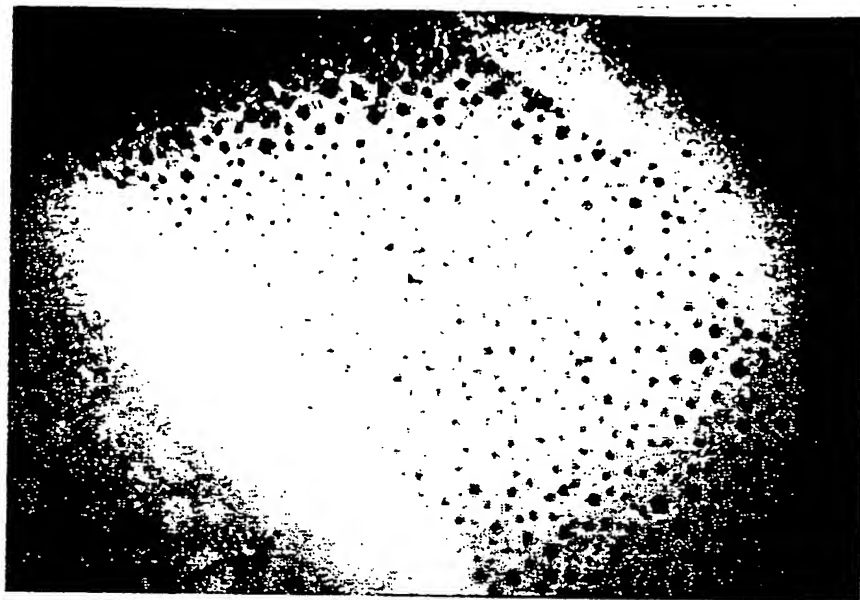
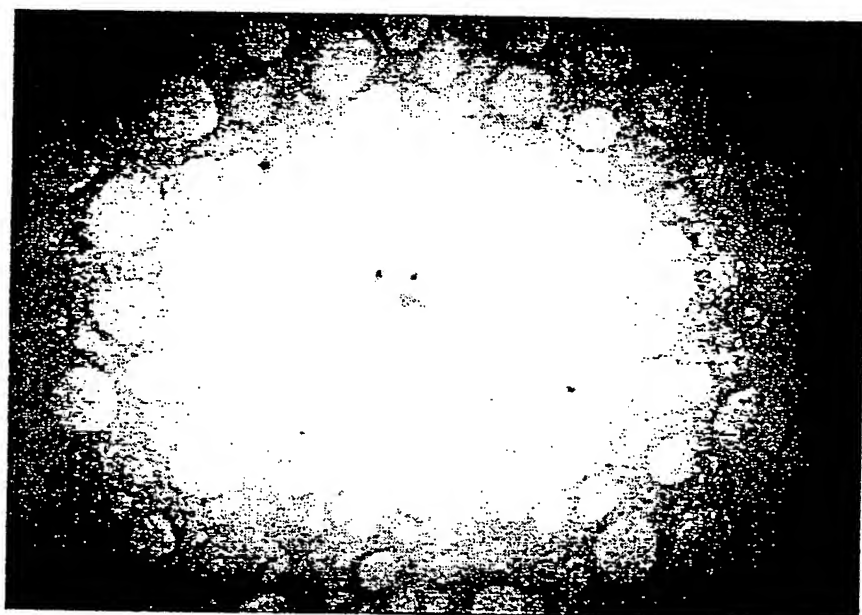


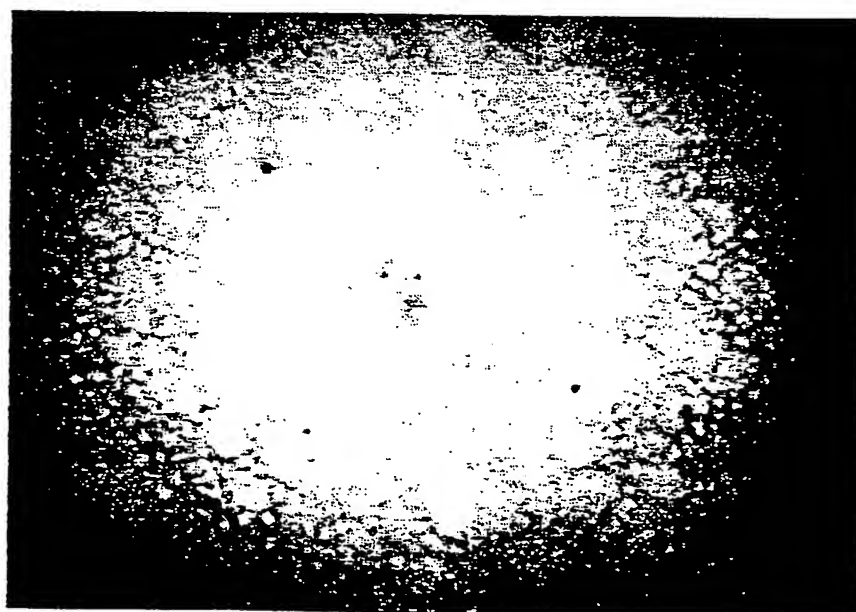
Fig. 5



*Fig. 6a*



*Fig. 6b*



*Fig. 6c*

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines bildenden Proteins aus einem Gram-positiven Bakterium, wobei  
5 das kanalbildende Protein durch Expression aus E.coli gewonnen wird.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**